

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Prediplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Lucija Marinović-Poljak
Metaboličko reprogramiranje tumorskih stanica:
Glavna obilježja i terapijski potencijal
Završni rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Prediplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Lucija Marinović-Poljak
Metaboličko reprogramiranje tumorskih stanica:
Glavna obilježja i terapijski potencijal
Završni rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc.Mirela Sedić

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Lucija Marinović-Poljak

Metabolic reprogramming of tumour cells:

Main features and therapeutic potential

Bachelor thesis

Rijeka, 2018.

Završni rad obranjen je dana: 17.9.2018.

Pred povjerenstvom:

1. doc.dr.sc.Ivana Ratkaj
2. doc.dr.sc.Elitza Petkova Markova-Car
3. izv.prof.dr.sc.Mirela Sedić

Rad ima 36 stranica, 5 slika, 1 tablica, 9 literaturnih navoda

Sažetak

Tumori su oduvijek bili zanimljiva tema raznih istraživanja, te je njihov promijenjeni metabolizam iznimno interesantan znanstvenicima u istraživanjima za antitumorsku terapiju. Stanice raka ne zahtijevaju potrošnju kisika kako bi proizvodile energiju kao što je to slučaj kod normalnih stanica. Umjesto toga, te stanice se oslanjaju na glukozu za otprilike 5 do 10 puta više od normalnih stanica za primarnu proizvodnju energije. Istraživači često aludiraju na stanice raka kao "metaboličke parazite" zbog njihove sposobnosti da "ukradu" energiju od domaćina kako bi potaknule svoj vlastiti rast. Organel odgovoran za preusmjeravanje metabolizma koji karakterizira stanice raka je mitohondrij. Mitohondriji u tumorskim stanicama sadrže mutiranu DNA i promjenjene strukture proteina i enzima. Te promjene povećavaju proizvodnju slobodnih radikala i narušavaju normalnu proizvodnju energije.

Ovim radom dan je pregled literature o mogućim metama tumorskog metabolizma koje bi se mogle ciljati kako bi se, u budućnosti, razvila moguća adekvatna protutumorska terapija. Fokus je na metabolički put glikolize, glutaminolize te oksidativne fosforilacije. U nastavku dan je detaljan opis na koji način tumori „promijene“ svoj metabolizam u odnosu na normalne stanice.

Ključne riječi: tumor, glikoliza, reprogramiranje, glukoza, glutamin, aminokiseline, mitohondriji.

Abstract

Tumors have always been an interesting topic of various research, and their changed metabolism is extremely interesting to scientists in antitumor therapy research. Cancer cells do not require oxygen consumption to produce energy as well as normal cells. Instead, these cells rely on glucose (sugar) for about 5 to 10 times the normal cells for their primary energy production. Researchers often allude to cancer cells as "metabolic parasites" because of their ability to "steal" energy from the hosts to boost their own growth. The organel responsible for redirecting the metabolism that characterizes cancer cells is a mitochondria. Mitochondria in tumor cells contain mutated DNA and modified structure of proteins and enzymes. These changes increase the production of free radicals and disrupt normal energy production.

This paper gives an overview of possible tumor metabolic targets that could be targeted in order to develop an adequate anti-tumor therapy in the future. Focus is given on the glycolysis, glutaminolysis and oxidative phosphorylation. The following is a detailed description of how the tumors "change" their metabolism relative to normal cells.

Key words: tumour, glicolysis, reprogramming, glucosis, glutamine, amionacids, mitochondria.

Sadržaj

Sažetak	5
Abstract	6
Uvod	8
Cilj rada.....	10
Glikoliza	11
Općenito o glikolizi	11
Regulacija glikolitičkih enzima	15
Glutamin.....	17
Masne kiseline.....	18
Potencijalni pristupi ciljanju TCA ciklusa(3).....	20
Molekularni regulatori reprogramiranja tumorskih stanica	21
Metabolizam glukoze i preživljavanje	25
Moguće mete	26
Transporteri glukoze	27
Heksokinaze	29
Drugi korak glikolize	30
Oksidativna fosforilacija	31
Zaključak	33

Uvod

Tumori zahtijevaju katabolite da proizvode ATP, održavaju redoks ravnotežu i generiraju biomase. Normalne stanice pretežno koriste glukozu, najčešće dostupni katabolit, za generiranje ATP-a. Glukoza se može metabolizirati putem glikolize s generacijom laktata u citoplazmi, ili kroz početne korake glikolize, nakon čega slijedi daljnji metabolizam piruvata preko ciklusa trikarboksilne kiseline (TCA ciklusa) i oksidativne fosforilacije u mitohondrijima. Glikoliza s proizvodnjom laktata proizvodi 2 mola ATP po molu glukoze, 18 puta manju od 36 molekula po molu glukoze koja nastaje putem TCA-oksidativne fosforilacije (OXPHOS). ATP se može brzo sintetizirati glikolizom, do 100 puta brže od OXPHOS, ali energetski prinos glikolize je znatno manji u odnosu na OXPHOS. Metabolička heterogenost omogućuje da se različite stanice metaboliziraju, potičući proliferaciju stanica i rast tumora. Oksidacijski stres koji inducira autofagiju, mitohondrijsku disfunkciju, visoke stope glikolize i oslobađanje katabolita iz tumorskih stanica, jedan je od mehanizama kojima se uspostavlja metabolički balans u tumorima; kataboliti generirani u tumorskim stanicama mogu se koristiti u normalnim stanicama u kojima dominira oksidativna fosforilacija (OXPHOS). Otpornost na staničnu smrt označava visoko maligne stanice i povezana je s promijenjenim metabolizmom¹. Nadalje, postoji metabolička heterogenost između tumora i tkiva domaćina. Na primjer, većina ljudskih tumora ima veće razine 2-deoksiglukoze od normalnih organa, s izuzetkom mozga. Dublje razumijevanje metaboličkih razlika između raka i normalnih stanica, te korištenje terapija koje iskorištavaju te razlike mogu poboljšati ishode liječenja raka. Većina ljudskih tumora je genetski različita, s brojnim onkogenima koji su aktivirani i s gubitkom višestrukih tumorskih supresora. Unatoč heterogenosti, koja čini većinu genetski jedinstvenih tumora, promjene na mnogim onkogenima i tumorskim supresorskim genima potiču zajednički metabolički fenotip. Zamka u

¹ (Phan LM, 2014)

kliničkim ispitivanjima koja su dizajnirana za testiranje lijekova koji ciljaju metabolizam (pregled dan u tablici 1. pri kraju dokumenta) jest da metabolički učinci na stanice raka i na normalne stanice unutar tumora ili u zdravih tkiva nisu karakterizirane. Metaboličko reprogramiranje tumorskih stanica prepoznato je kao moguća meta za ubijanje tumorskih stanica jer je važno za malignu transformaciju i proliferaciju tumora. Neke od najočitijih promjena u bioenergetici tumorskih stanica uključuju povećanje glikolize, povećanje glutaminolitičkog protoka, povećanje metabolizma aminokiselina i lipida, indukcija pentozna-fosfatnog puta i biosinteze makromolekula. Ovi metabolički putevi osiguravaju stanicama raka ne samo energiju nego i metabolite koji potiču biosintezu makromolekula, kontinuiranu proliferaciju i druge glavne procese tumorske geneze. Onkogeni kao c-Myc, HIF1 α , Ras i PI3K/Akt su važni promotori metaboličkih promjena u stanicama raka..² Nasuprot tome, glavni supresori tumora kao što su p53 i LKB1 / AMPK antagoniziraju te promjene i osiguravaju ravnotežu staničnog metabolizma. ³

² (Phan LM, 2014)

³ (Hanahan D., 2011.)

Cilj rada

Cilj rada je pružiti uvid u načine na koje tumorske stanice reprogramiraju svoje metaboličke puteve, uočiti razlike između normalnog i tumorskog metabolizma, te dati pregled postojeće terapije koja djeluje na tumorski metabolizam te koje su mogućnosti za razvoj terapije u budućnosti.

Glikoliza

Općenito o glikolizi

Glikoliza, od grčke riječi glykys, što znači "slatko", liza, otapanje, slom, može se definirati kao slijed enzimatskih reakcija koje, u citosolu, u odsutnosti kisika, dovode do pretvorbe jedne molekule glukoze (6 C atoma) na dvije molekule piruvata (3 C atoma), s popratnom generacijom dvije molekule ATP-a, univerzalne energetske molekule u biološkim sustavima. Ovaj put, koji ne zahtijeva kisik, odigrao je ključnu ulogu u metaboličkim procesima tijekom prve 2 milijarde godina evolucije života i vjerojatno predstavlja najstariji biološki mehanizam za izdvajanje energije iz organskih molekula kada je dostupnost kisika niska. Osim toga, to je izvor prekursora za aerobni katabolizam i za različite biosintetske procese.⁴

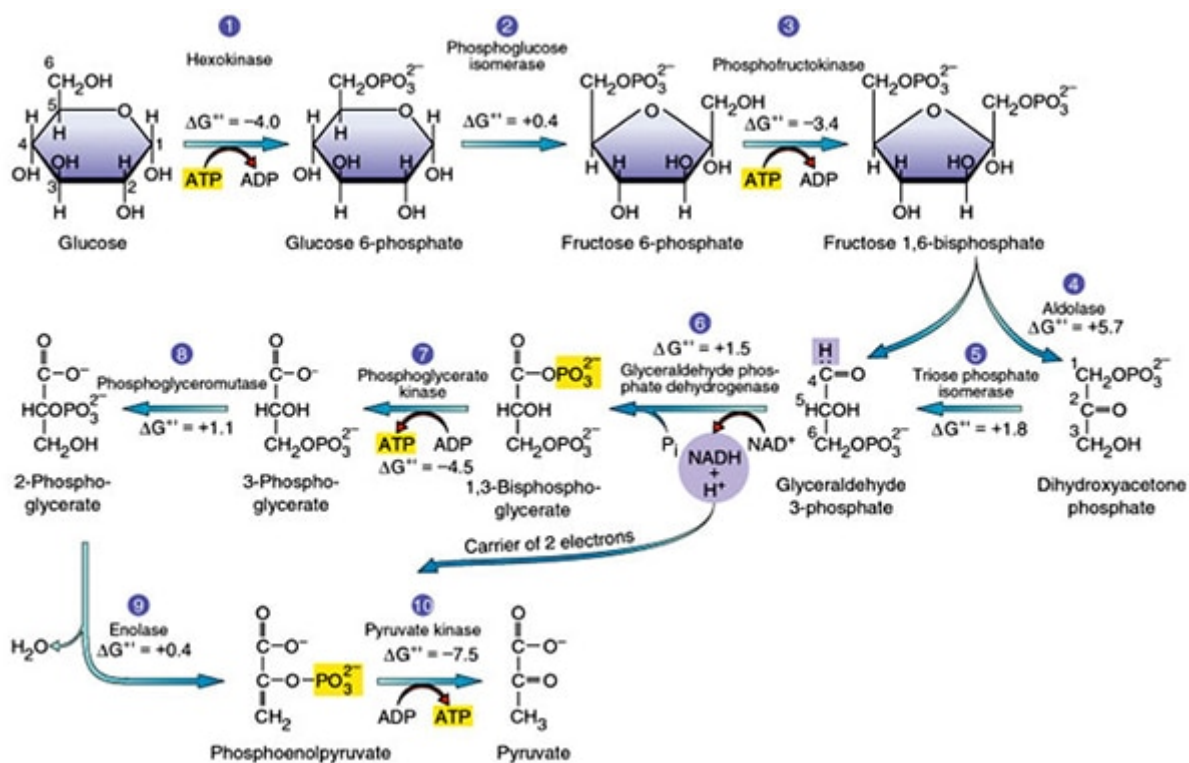
U usporedbi s normalnim stanicama, stanice raka preferiraju glikolizu čak pri normoksičnim uvjetima. Taj fenomen je poznatiji pod imenom Warburgov efekt⁵. Ovaj metabolički fenomen nazvan je po dr. Ottu Warburgu koji ga je prvi zabilježio 1939. godine. U normalnim stanicama, glukoza se katabolizira u piruvat koji se pretvara u acetil-CoA da bi se Krebsov ciklus mogao normalno odvijati (slika 1). U Krebsovom ciklusu se generira NADH i FADH₂ koji su potrebni za respiracijski ciklus u mitohondriju. Ovaj metabolički put je od velike koristi, iz razloga što se razgradnjom jedne molekule glukoze generira 36 molekula ATP-a. U normalnim stanicama, glikoliza je prioritetni metabolički put samo pri ograničenoj opskrbi kisikom. S druge strane, stanice raka koriste glukozu čak i u izobilju kisika – (aerobna glikoliza ili Warburgov efekt), po čemu se razlikuje od normalne anaerobne glikolize zdravih stanica. Tumorske stanice, za razliku od, normalnih stanica moraju nadoknaditi 18 puta nižu energetske učinkovitost (glikoliza generira samo 2 molekule ATP-a po molekuli glukoze, dok staničnim disanjem nastane 36 molekula za svaku

⁴ (N, 2016.)

⁵ (O., 1956)

kataboliziranu molekulu glukoze). Kako bi to postigle, tumorske stanice moraju povećati aktivnost transportera glukoze, posebice Glut1, Glut2, Glut3 i Glut4 kako bi se povećala koncentracija glukoze. Povećan unos glukoze glavna je značajka po kojoj se tumorske stanice razlikuju od normalnih stanica.

Glikoliza uključuje nekoliko reverzibilnih enzimatskih reakcija te tri ireverzibilne reakcije (slika 1). Prva dva koraka glikolize troše ATP, dok se u trećem ATP generira. Prvi korak je kataliziran heksokinazama koje fosforiliraju glukozu za proizvodnju glukoza-6-fosfata. Ova fosforilacija je najvažniji korak u metabolizmu glukoze, iz razloga da glukoza ostaje u stanici, ne izlazi van pomoću transportera, te zato što se glukoza-6-fosfat koristi i u pentoza fosfatnom putu. Tumorske stanice prvi korak glikolize potiču na način da povećavaju unos glukoze i pojačavaju eksprimiraju heksokinazu2 (HK2).⁶(4)



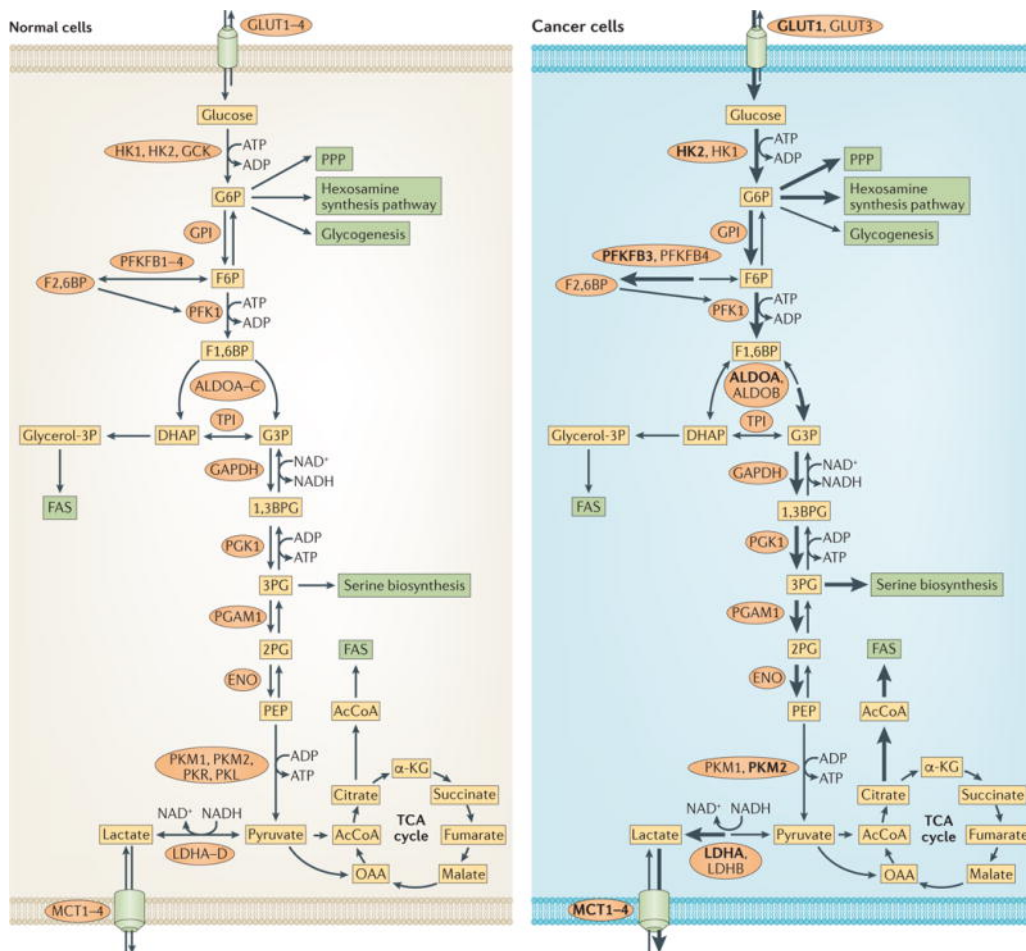
Slika 1-shematski prikazan proces glukoze u normalnim stanicama s jasno naznačenim koproduktima i enzimima koji sudjeluju u formiranju. Glikoliza je prva faza razlaganja šećera koja se odvija u citoplazmi. Može se odvijati i pri aerobnim i pri anaerobnim uvjetima. Kod aerobnih uvjeta produkti razgradnje glukoze ulaze u Krebsov ciklus, a kod anaerobne glukoze dokazi do alkoholnog ili mliječnog vrenja. Da bi uopće ušli u proces glukoze, šećeri moraju biti fosforilirani, dakle, glukopza se fosforilira pretvara u fruktoru koja se dalje fosforilira. Nastala fruktoza-1,6-bisfosfat se razlaže na 2 trioze gliceraldehid-3-fosfat i dihidroksiaceton-fosfat koje prelaze jedna u drugu. Najvažnija reakcija glikolize je oksidacija gliceraldehid-3-fosfata u trifosfoglicerinska kiselina, NAD se reducira u NADH+ i H⁺.

⁶ (N, 2016.)

Tumori imaju značajno povećanu ekspresiju i ostalih ključnih glikolitičkih enzima, kao što su Ras, Myc, i HIF-1 α . Smatraju se glavnim tumorskim indukcijskim faktorima. C-Myc i HIF-1 α prepoznaju se kao glavni induktori tumorske glikolize na način da povećavaju ekspresiju ključnih glikolitičkih enzima kao što su heksokinaza 2, fosfofruktokinaza 1, triozafosfat izomeraza 1. U principu, većina promotorskih regija u genima koji kodiraju glikolitičke enzime sadrži HIF-1 α i Myc vezujuće motive kako bi se tumorima omogućio kontinuiran protok glikolize, a to je važno za njihovu brzu proliferaciju.⁷

Tumorske stanice također drugačije procesiraju piruvat – krajnji proizvod glikolize (slika 2). U normalnih stanica, on se pretvara u acetil-CoA, a mala količina se pretvara u alanin ili laktat. Upravo je ta pretvorba u alanin ili laktat važna za tumore uslijed povećane regulacije laktat dehidrogenaze A. Ta reakcija je korisna za stanice jer pomaže regenerirati NADH da bi se glikoliza ubrzala. Enzimi koji kataliziraju reverzibilnu konverziju piruvata u laktat su laktat dehidrogenaze (LDH) i kodirani su s četiri odvojena gena (LDHA, LDHB, LDHC i LDHD). Laktat dehidrogenaza A potiče reverzibilnu reakciju, a laktat dehidrogenaza B potiče ireverzibilnu reakciju. Zbog reverzibilne aktivnosti laktat dehidrogenaze, izlučivanje laktata iz stanice preko monokarboksilatnih transportera (MCTs) je potrebno za usmjeravanje reakcije kao i za sprečavanje zakiseljavanja unutarstaničnog prostora. Budući da laktat inhibira aktivnost fosfofruktokinaze 1, važno je spriječiti njegovu intracelularnu akumulaciju kako bi se izbjegla inhibicija drugog počinjenog koraka glikolize. Međutim, izlučeni laktat može imati važnu ulogu za stanice raka. Zakiseljavanje tumorskog mikrookoliša moglo bi potencijalno potaknuti invazivnost tumora, dijelom kroz povećanje razine izvanstaničnog vaskularnog endotelnog faktora rasta A (VEGFA) i proteaza.

⁷ (N, 2016.)



Slika 2-Promjene koje se javljaju u metabolizmu glukoze stanica raka.U usporedbi s normalnim stanicama (lijevo), tok metabolizma glukoze i glikolize ubrzava se u stanicama raka (desno) pomoću preferencijalne ekspresije transportera i enzimskih izoformi koji pomažu protoku glukoze i prilagođavaju se anaboličkim zahtjevima stanica raka. Enzimi koji kataliziraju metaboličke reakcije prikazani su u ovalima. Enzimi koji su pojačano ekspimirani u stanicama raka podebljano su prikazani na slici. Debljina strelica pokazuje relativni tok. 1,3BPG, 1,3-bisfosfoglicerat; 2PG, 2-fosfoglicerat; 3PG, 3-fosfoglicerat; α -KG, α -ketoglutarat; AcCoA, acetyl-CoA; ALDO, aldolaza; DHAP, dihidroksiacetone-fosfat; ENO, enolaza; F1.6BP, fructose-1,6-bisphosphate; F2.6BP, fruktoza-2,6-bisfosfat; F6P, fruktoza-6-fosfat; FAS, sinteza masnih kiselina; G3P, gliceraldehid-3-fosfat; G6P, glukoza-6-fosfat; HK, heksokinaza; LDH, laktat dehidrogenaza; GAPDH, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; GSK, glukokinaza; GLUT, prijenosnik glukoze; glicerol-3P, glicerol-3-fosfat; GPI, glukoza-6-fosfat izomeraza; MCT, monokarboksilat transporter; OAA, oksaloacetat; PEP, fosfoenolpiruvat; PFK1, fosfofruktokinaza 1; PFKFB, 6-fosfofrukto-2-kinaza / fruktoza-2,6-bisfosfat; PGAM1, fosfoglicerat mutaza 1; PGK1, fosfoglicerat kinaza 1; PK, piruvat kinaza; PPP, pentoza fosfatni put; TCA, trikarboksilna kiselina; TPI, triosfosfat izomeraza. Slika preuzeta s: <https://www.nature.com/articles/nrc.2016.77>

Regulacija glikolitičkih enzima

Enzimi koji kataliziraju korake glikolize kontrolirani su alosterički, npr. enzimi s visokim afinitetom heksokinaza 1 i heksokinaza 2 (HK1 i HK2), (kataliziraju prvi korak glikolize u kojem se glukoza fosforilira u glukoza-6-fosfat), kontrolirani su vlastitim katalitičkim proizvodom, glukoza-6-fosfat (G6P), i uzrokuju disocijaciju od mitohondrija. Drugi korak glikolize (konverzija fruktoza-6-fosfata (F6P) u fruktoza-1,6-bisfosfat (F1,6BP)) kataliziran je tetramerom fosfofruktokinaze 1 (PFK1) koji je kodiran različitim genima, npr. PFKM (gen koji kodira za fosfofruktokinazu u mišićima), PFKL (gen koji kodira za fosfofruktokinazu u jetri) te PFKP (gen koji kodira za fosfofruktokinazu u trombocitima). Alosterički aktivator podjedinica fosfofruktokinaze 1 (PFK1) (slika 3) je fruktoza-2,6-bisfosfat (F2,6BP), koji se dobiva iz F6P-6-fosfofruktokinaza (PFKFB). Ovaj enzim sadrži dvije domene sa suprotnim aktivnostima. Jedna domena ima kinaznu aktivnost koja fosforilira fruktoza-6-fosfat do fruktoza-2,6-bisfosfat, a druga ima aktivnost fosfataze koja defosforira fruktoza-2,6-bisfosfat u fruktoza-6-fosfat. Budući da je fruktoza-2,6-bisfosfat alosterički aktivator fosfofruktokinaze 1, kinazna i fosfatazna aktivnost fruktoza-2,6-bisfosfataza mogu odrediti aktivnost fosfofruktokinaze 1 i intracelularne razine fruktoza-6-fosfata i fruktoza-1,6-bisfosfata. Kinazna i fosfatazna aktivnost svake izoforme različite su, a njihove razine ekspresije variraju u različitim tkivima sisavaca i različitim vrstama karcinoma.⁸ Izoforma fruktoza-2,6-bisfosfataze, koja ima veću kinaznu od fosfatazne aktivnosti, povećava se u tumoru, čime se povećava intracelularna razina fruktoza-2,6-bisfosfata i alosterička aktivacija fosfofruktokinaze 1. Fosfofruktokinaza 1 je inhibirana pomoću PEP, laktata, citrata, palmitoil-CoA i ATP-a, koji su produkti glikolize, a inhibicijom fosfofruktokinaze 1, posebice pomoću citrata i palmitoil-CoA, glukoza se preusmjerava u put pentozta fosfata kako bi se stvorile dovoljne količine NADPH za lipogenezu i borbu protiv oksidacijskog

⁸ (N, 2016.)

stresa. Zanimljiv podatak je da je aktivnost fosfofruktokinaza 1 inhibirana glikozilacijom na serinu 529, iste aminokiseline koja je potrebna za vezanje na njegov alosterični aktivator fruktoza-2,6-bisfosfat. Stoga, glikozilacija inhibira alosteričku aktivaciju fosfofruktokinaze 1 pomoću fruktoza-2,6-bisfosfata.

PKM2(izozim piruvat kinaze M1/M2), koji je glavni katalizator trećeg koraka glikolize, u kojem se fruktoza-6-fosfat pretvara u fruktoza-1,6-bisfosfat, aktivira se s fruktoza-1,6-bisfosfatom(katalitički produkt fosfofruktokinaze 1) i serinom. Međutim, visoke razine fruktoza-1,6-bisfosfata i serina ukazuju na to da nema potrebe za vraćanjem fruktoza-6-fosfata natrag u put pentoza fosfat ili za skretanje drugih metabolita na biosintezu serina i stoga glikoliza može normalno odvijati da bi se generirao ATP⁹. Važno je da aktivnost PKM2 inhibira reaktivne kisikove vrste (ROS) kroz oksidaciju cisteina 358 i time regulira redoks stanje stanice. Ova inhibicija PKM2 mogla bi potencijalno usmjeriti metabolite k biosintezi serina i putevima metabolizma jednog ugljika, te povećati protok glukoze u oksidativnom PPP u za borbu protiv oksidativnog stresa.

Glukoza ulazi u stanicu pomoću transportera glukoze (GLUT)¹⁰ i služi kao najčešći izvor goriva u stanicama sisavaca. U normalnim stanicama, većina stanične glukoze ulazi u ciklus TCA u obliku piruvata, premda se glukoza može koristiti i za proizvodnju laktata ili sintezu putem pentoza fosfatnog puta. Kroz glikolizu, jedna molekula glukoze se pretvara u dvije molekule piruvata, koje se oksidiraju da se dobije acetil-CoA koji je potreban za TCA ciklus. Alternativno, pod hipoksičnim uvjetima, piruvat se može prevesti i u laktat. Stanice raka značajno povećavaju potrošnju glukoze, a dodatno ju dobivaju povećavanjem GLUT1 i GLUT3 transportera glukoze. Ne samo da stanice raka povećavaju brzinu unosa glukoze i

⁹ (N, 2016.)

¹⁰ (Shinohara Y., 1994)

iskorištavanja glukoze, već se i sudbina uvezene glukoze razlikuje se od onog u normalnim stanicama. Da bi zadovoljili svoje povećane energetske potrebe, stanice raka okreću se drugim izvorima energije, poput glutamina, koji ulazi u ciklus TCA.

Glutamin¹¹

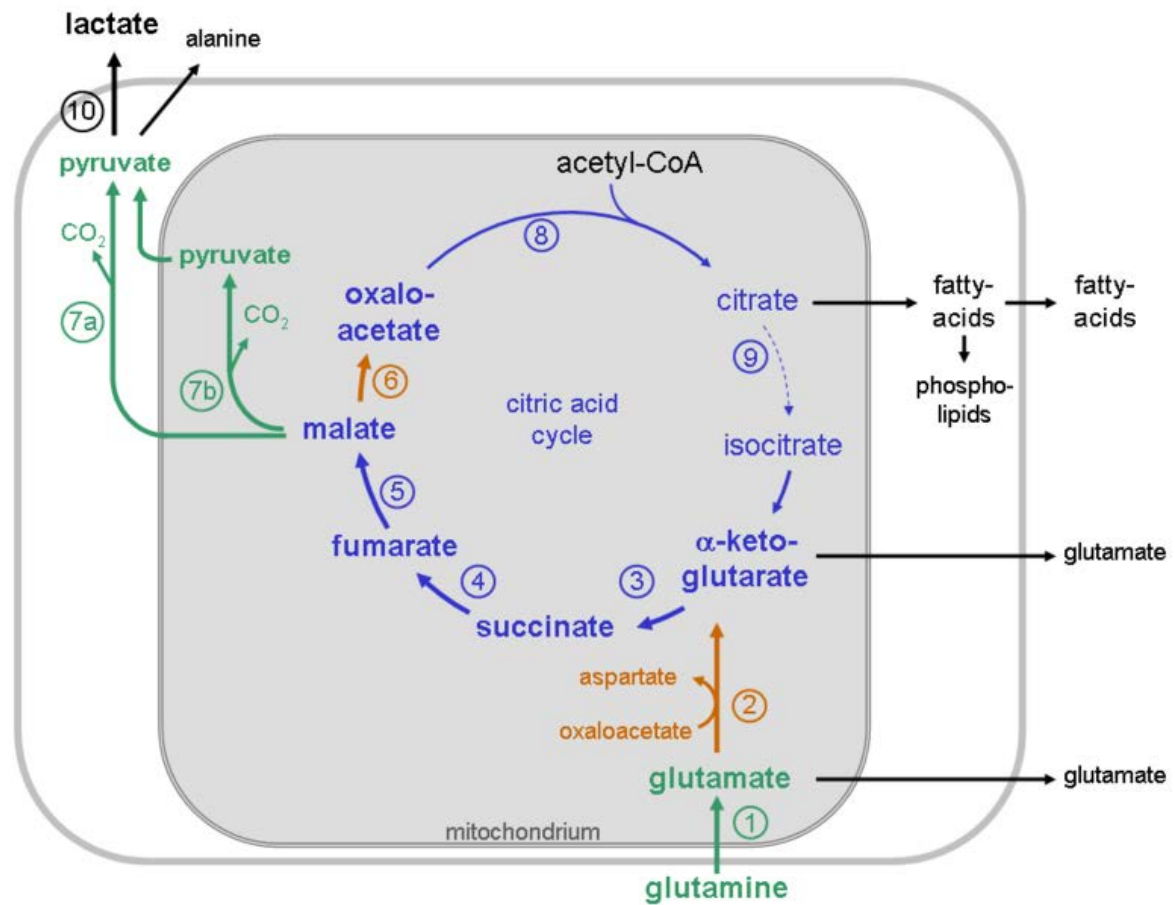
Osim glukoze, aminokiseline također mogu biti supstrat u TCA ciklusu. Amino kiseline ulaze u ciklus nakon što su pretvorene u acetil-CoA ili α -keto kiselinske međuprodukte: piruvat, oksaloacetat i sukcinil-CoA. Glutaminoliza, razgradnja glutamina, važna je za obnavljanje intermedijera TCA ciklusa u proliferirajućim stanicama. Glutamin se najprije hidrolizira glutaminazom (GLS) da se dobije glutamat, koji se zatim dehidrogenizira glutamat dehidrogenazom (GLUD) da se dobije α -KG (slika 4). α -KG je supstrat za oksidativnu dekarboksilaciju pomoću KGDHC (α -ketoglutarar dehidrogenazni kompleks) ili za reduktivnu karboksilaciju pomoću IDH2 (gen koji kodira za izocitrat dehidrogenazu 2).

Važnost glutaminolize u proliferaciji karcinoma uočena je prije desetljeća od znanstvenika Harry Eagle-a, koji je utvrdio da HeLa stanice preferiraju molarni suvišak od 10 do 100 puta glutamina za maksimalni rast. Zbog prekomjerne konverzije glukoze u laktat, stanice tumora koriste anaplerotične¹² reakcije za nadopunu intermedijera TCA ciklusa, što se u velikoj mjeri postiže povećanom glutaminolizom. Da bi to postigle, stanice raka reguliraju i transportere glutamina i enzime koji kataliziraju glutaminolizu, čime se razdvajaju ovaj put od onih posredovanih faktorom

¹¹ (Altman B, 2016.)

¹² Kada međuprodukti izađu iz citratnog ciklusa, kako bi se iskoristili za druge putove, oni se nadomještaju produktima anaplerotičnih reakcija. Produkti anaplerotičnih reakcija nastaju reakcijama karboksilacije, pa tako iz spojeva s tri ugljika nastaju spojevi s četiri ugljikova atoma. Ove reakcije kataliziraju piruvat karboksilaza, PEP karboksikinaza, PEP karboksilaza i malični enzim. Enzimi koji kataliziraju karboksilacije uobičajeno koriste biotin za aktivaciju i prijenos CO₂ do akceptora kao što su piruvat ili fosfoenolpiruvat (PEP).

rasta. Proto-onkogen MYC je regulator glutaminolize i aktivira prijenosnike glutamina i GLS (glutaminaze).



Slika 4- koraci u procesu oksidacije glutamina. <https://en.wikipedia.org/wiki/Glutaminolysis#/media/File:Glutaminolysisengl2.png>

Slika preuzeta s:

Masne kiseline

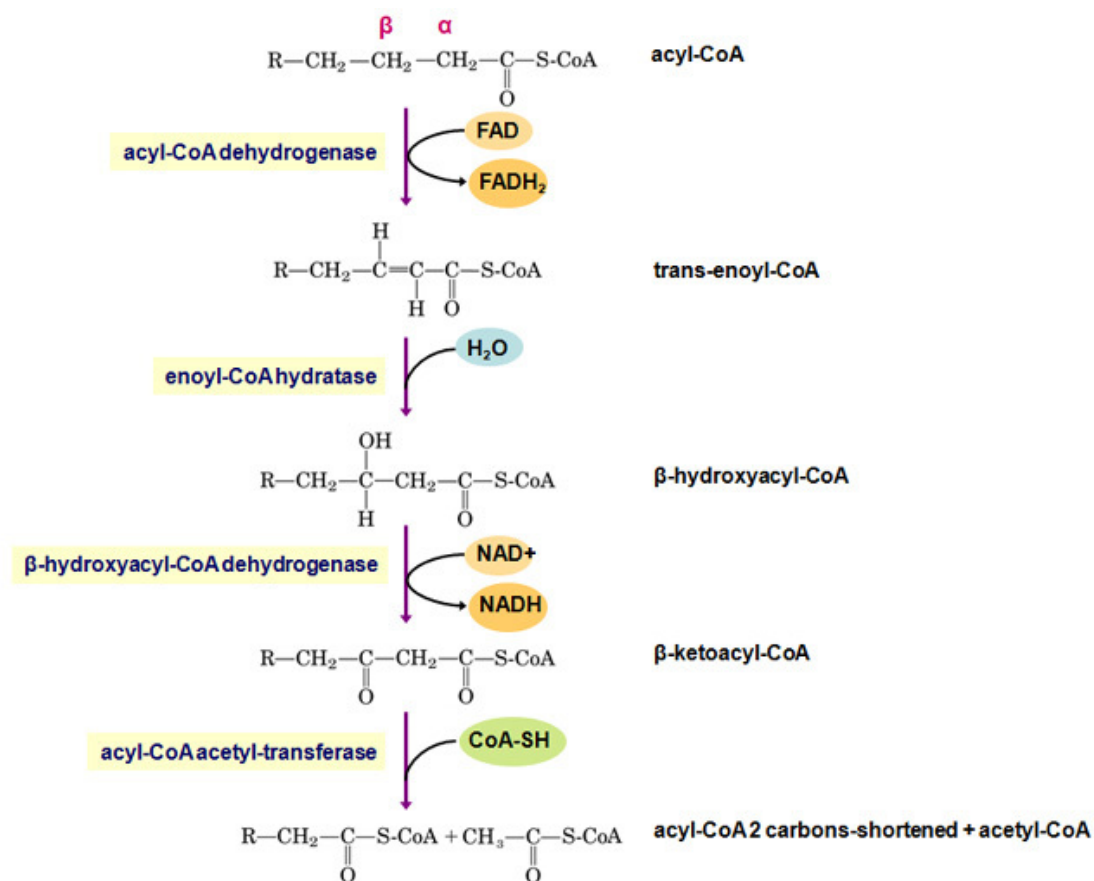
Treća vrsta izvora energije u stanicama raka jesu masne kiseline koje ulaze u TCA ciklus nakon što prolaze kroz β -oksidaciju da bi se dobio acetil-CoA. U procesu β -oksidacije (slika 5), acilni lanac podliježe oksidaciji, uvodi se dvostruka veza. Konačno, koenzim A cijepa acilni rep tako da ga dodaje na acetil-CoA i smanjuje se duljina lanca masnih kiselina za dva ugljika¹³. *De novo* sinteza masnih kiselina ključna je za

¹³ (Altman B, 2016.)

opskrbu lipidima za stvaranje staničnih membrana u brzo proliferirajućim stanicama, a regulirana je enzimima adenozin trifosfat citrat liaza (ACLY), acetil-CoA karboksilaza (ACC). ACLY pretvara citrat u oksaloacetat i citosolni acetil-CoA (slika 4). Ovaj citosolni acetil-CoA je karboksiliran pomoću ACC da bi se formirao malonil-CoA, koji se zatim veže s dodatnim acetil-CoA dok se ne formira nezasićena masna kiselina-palmitat sa 16 ugljika. Palmitat se zatim može modificirati tako da se formiraju dodatne potrebne komponente stanične membrane.¹⁴

Dok se enzimi koji reguliraju sintezu lipida često eksprimiraju u niskim razinama u većini normalnih tkiva, oni su pretjerano eksprimirani u više vrsta karcinoma. ACLY je prekomjerno eksprimiran u karcinomu pluća nemalih stanica, raka dojke i raka grlića maternice među ostalima. U tumorskim stanicama gdje je potražnja mnogo veća, lipogeneza se odvija preko ovih prekomjerno eksprimiranih enzima. Povećana aktivacija i prekomjerna ekspresija tih enzima u tumorima korelira s progresijom bolesti, slabom prognozom, te se istražuje kao potencijalni biomarker metastaza.

¹⁴ (Altman B, 2016.)



Slika 5-shema mitohondrijske β -oksidacije masnih kiselina . Slika preuzeta s: <https://www.nature.com/scitable/content/reactions-of-oxidation-14897250>

Potencijalni pristupi ciljanju TCA ciklusa¹⁵

Terapijsko usmjeravanje funkcije TCA ciklusa u karcinomu je atraktivna strategija za liječenje raka, a dvije se trenutačno ispituju u klinici. Mnogi tumori koriste glutamin kao izvor goriva za TCA ciklus, čime je suzbijanje glutaminolize putem malih molekula inhibitora atraktivan pristup u liječenju raka. Inicijalna strategija koristi analoge glutamina, kao što je 6-diazo-5-okso-L-norleucin, za ciljanje glutaminolize. Dok ti spojevi naglašavaju potencijal ciljanja glutamina, oni u konačnici nisu uspjeli ući u kliniku zbog visoke toksičnosti za tkiva. Dodatne studije pokazale su da ograničenje razine glutamina, bilo kroz odstranjivanje glutamina u plazmi (L-aspariginaza) ili blokiranje transporta glutamina (sulfasalazin), može imati terapijsku korist. Nedavno su GLS inhibitori, kao što je CB-839,

¹⁵ (Martinez-Outschoorn UE, 2017.)

oralno dostupni, pokazali anti-tumorsku učinkovitost. CB-839 prekida konverziju glutamina u glutamat, što uzrokuje prestanak proizvodnje glutationa i sinteze aminokiselina. Klinička ispitivanja faze I trenutno su u tijeku za CB-839, i ispituje se njegova učinkovitost za liječenje tumora.

Molekularni regulatori reprogramiranja tumorskih stanica

Ne postoje univerzalni mehanizmi kojima tumorske stanice reprogramiraju metabolizam glukoze, ali postoji nekoliko uobičajenih mehanizama kojima moduliraju tri počinjena koraka u glikolizi, kao i unos glukoze, da bi ispunile svoje anaboličke zahtjeve. Na te uobičajene mehanizme najveći utjecaj imaju pojedini onkoproteini i tumor supresorski geni. Neki od tih mehanizama preklapaju se s mehanizmima posredovanih hipoksijom i transkripcijskim faktorom hypoxia inducible factor 1 (HIF1) da bi se ubrzao metabolizam glukoze. HIF1 povećava ekspresiju glukoznog transportera GLUT1 (također poznat kao SLC2A1) i heksokinaze 2 kako bi se povećao unos glukoze i fosforilacija (prvi počinjeni korak glikolize). Sukladno tome, onkogeni KRAS, BRAF i aktivirani AKT povećavaju ekspresiju i translokaciju GLUT1 i drugih transportera glukoze.¹⁶ Ekspresija heksokinaze 2 je u tumorskim stanicama inducirana pomoću višestrukih mehanizama i onkogenih induktora, a transkripcijski je regulirana pomoću MYC18,. AKT potiče povezivanje heksokinaze 1 i 2 s mitohondrijom, a heksokinaza 2 fosforilira AKT.

Ekspresija PFKFB3, koji generira stvaranje fruktoza-2,6-bisfosfata (alosterični aktivator fosfofruktokinaze 1) je induciran s HIF1. PFKFB3 je eksprimiran u stanicama raka čak i pri normalnim uvjetima. AKT aktivira fosfofruktokinazu 1 fosforilacijom i aktivacijom PFKFB2. No, aktivacija fosfofruktokinaze 1 nije nužno korisna za tumorske stanice u svim

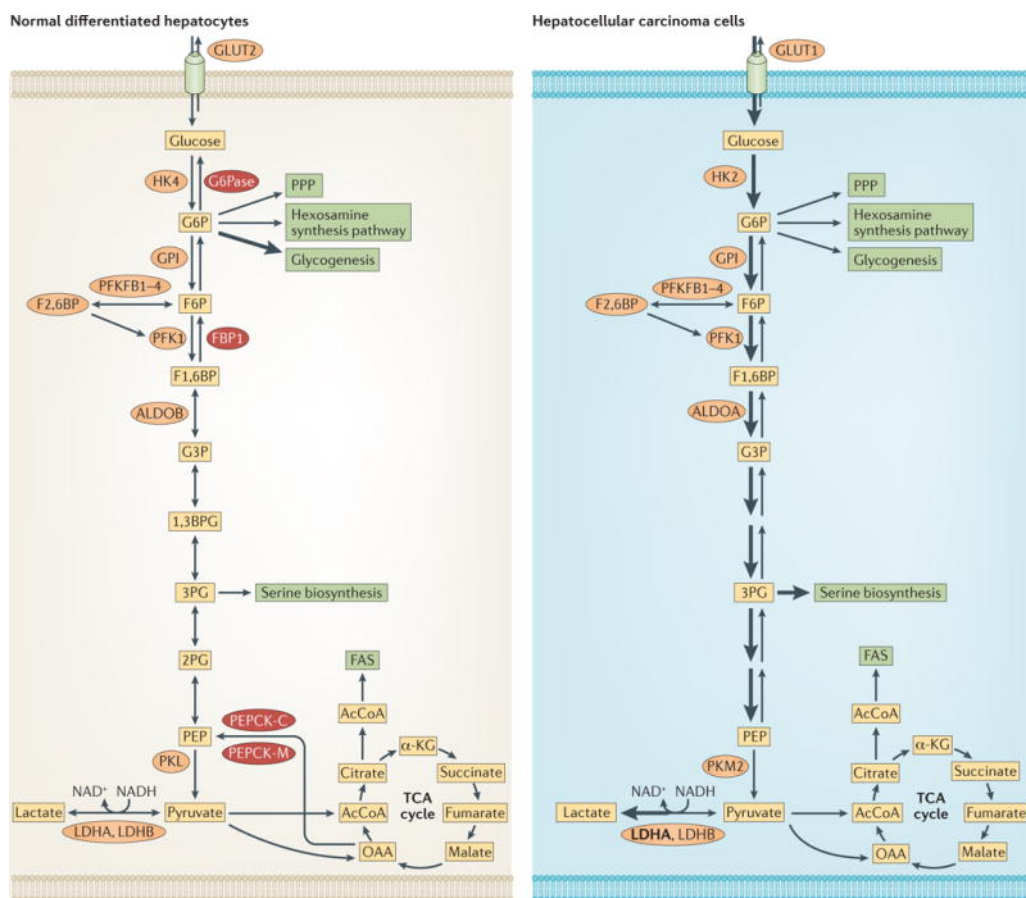
¹⁶ (Martinez-Outschoorn UE, 2017.)

uvjetima. Na primjer, u uvjetima oksidativnog stresa, važno je smanjiti aktivnost fosfofruktokinaze 1 da se glukoza preusmjeri u put pentoza fosfata i da bi se NADPH generirao upravo za zaštitu od oksidativnog stresa. Sukladno tome, aktivirana fosfofruktokinaza 1, u tumorskim stanicama, mora biti podložan inhibiciji citratom i palmitoil-CoA da bi se fruktoza-6-fosfat mogao povratiti u put pentoza fosfata i dati NADPH za lipogenezu. HIF1 također povećava ekspresiju LDHA(laktat dehidrogenaza A) i MCT4(monokarboksilat transporter 4) da bi se povećala pretvorba piruvata u laktat i aktiviralo njegovo izlučivanje iz stanice. Slično, razina ekspresije LDHA, MCT1 i MCT4 povećava se u karcinomu. MYC, koji je često dereguliran u različitim vrstama karcinoma, transkripcijski povećava ekspresiju LDHA i MCT1.

Mutacije p53 tumor supresora uključene su u kontrolu metabolizma glukoze na način da p53 inducira glikolizu i regulatore apoptoze(TIGAR-antiapoptotska molekula), a ta uloga je slična PFKB-koji smanjuje razinu fruktoza2,6-bisfosfata. Slijedom toga, razina fruktoza-6-fosfata se povećava kao rezultat smanjene aktivnosti PFK1 te je fruktoza-6-fosfat preusmjeren u put pentoza fosfata za generiranje NADPH, održavanje redoks stanja stanica i povećanje razine riboza-5-fosfata za sintezu ribonukleotida. Budući je pretvorba glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat reverzibilan korak, nakupljanje fruktoza-6-fosfata također može povećati razinu glukoza-6-fosfata i stoga njegovu inhibiciju. Međutim, TIGAR se veže na heksokinazu 2 i promovira njegovu aktivnost na mitohondrijima putem PFKFB neovisnog mehanizma, posebno pod hipoksičnim uvjetima.

Najbolje je istražen primjer na koji način tumorske stanice reprogramiraju glikolizu je hepatocelularni karcinom(HCC)(slika 6).¹⁷

¹⁷ (Martinez-Outschoorn UE, 2017.)



Slika 6- Reprogramiranje metabolizma glukoze u hepatocelularnom karcinomu

Diferencirani hepatociti koriste transporter glukoze, GLUT2, za unos i izvoz glukoze. Prvi počinjeni korak u metabolizmu glukoze je atenuiran jer je kataliziran heksokinazom niskog afiniteta, HK4 (također poznatom kao glukokinaza). Tri počinjena koraka u metabolizmu glukoze mogu postati reverzibilnima pomoću glukoneogenih enzima (tamno crvena). Glukoza-6-fosfataza (G6Pase) defosforizira glukoza-6-fosfat (G6P) natrag u glukozu. Fruktosa-1,6-bisfosfataza (FBP1) vraća se fruktoza-6-fosfatu (F6P) i fosfoenolpiruvat karboksi kinaza (PEPCK) pretvore zadnji počinjeni korak u glikolizu prevođenjem oksaloacetata (OAA) do fosfoenolpiruvata (PEP), kako u mitohondrijima tako i preko citoplazme PEPCK-C, u enzim PEPCK-M. U hepatocelularnom karcinomu potiskivanje ekspresije HK4 i indukcija HK2 i suzbijanje ekspresije glukoneogenog (HCC). Metabolizam glukoze ubrzava se ekspresijom GLUT1, enzima. Za razliku od diferenciranih hepatocita, HCC stanice ekspresiraju relativno visoke razine aldolaze A (ALDOA), oni ekspresiraju piruvatnu kinazu M2 (PKM2) umjesto PKL i povećavaju ekspresiju laktat dehidrogenaze A (LDHA, prikazano podebljano). Debljina strelica pokazuje relativni tok. 1,3BPG, 1,3-bisfosfoglicerat; 2PG, 2-fosfoglicerat; 3PG, 3-fosfoglicerat; α-KG, α-ketoglutarat; AcCoA, acetil-CoA; F2,6BP, fruktoza-2,6-bisfosfat; F6P, fruktoza-6-fosfat; FAS, sinteza masnih kiselina; G3P, gliceraldehid-3-fosfat; GPI, glukoza-6-fosfat izomeraza; PFK1, fosfofruktokinaza 1; PFKFB, 6-fosfofrukto-2-kinaza / fruktoza-2,6-bisfosfataza; PPP, pentoza fosfatni put. Slika preuzeta s: <https://www.nature.com/articles/nrc.2016.77>

Primarna funkcija normalnih diferenciranih hepatocita je regulacija razine glukoze u cirkulaciji. Stoga je njihov intracelularni metabolizam glukoze prilagođen upravo ovoj funkciji. Normalni hepatociti konzumiraju glukozu te ju također i izlučuju; njihov glavni transporter glukoze je GLUT2, a jedna od njegovih glavnih karakteristika je visoka razina reverzibilnog protoka glukoze kroz membranu.¹⁸ Normalni hepatociti pohranjuju glukozu u obliku glikogena ili taj glikogen razgrađuju ovisno o sistemskim potrebama za glukozom. Hepatociti se također razlikuju od većine drugih stanica u tijelu zbog svoje sposobnosti da provode glukoneogenezu, koja ide u suprotnom smjeru od glikolize. Ti enzimi su glukoza-6-fosfataza (G6PC), fruktoza-1,6-bisfosfataza (FBP1) te naposljetku, fosfoenolpiruvat karboksinaza (PEPCK).¹⁹

Međutim-kod HCC-dolazi do opsežnog reprogramiranja tih metaboličkih puteva. Prvi, glavni transporter glukoze u HCC-u je GLUT1, a ne GLUT2-koji ima visoki obrnuti protok glukoze. Drugi put jest suzbijanje ekspresije heksokinaze 4 i indukcija heksokinaze 2. Treći jest postojanje izoforme aldolaze, enzima koji reverzibilno cijepa fruktoza-1,6-bisfosfat na dihidroksiaceton fosfat (DHAP) i glukoza-3-fosfat. Postoje tri izoforme aldolaze, koje su kodirane s tri različita gena (ALDOA, ALDOB i ALDOC). Aldolaza B je glavna izoforma u normalnim diferenciranim hepatocitima, no njezina je ekspresija suprimirana u HCC, a inducirana je ekspresijom aldolaze A. Aldolaza B katalizira kondenzaciju dihidroksiaceton fosfata i glukoza-3-fosfata u fruktoza-1,6-bisfosfat učinkovitije od aldolaze A, dok je aldolaza A učinkovitija pri cijepanju fruktoza-1,6-bisfosfat. Aldolaza A je također dominantna izoforma eksprimirana u drugim vrstama karcinoma. Povezana je s F-aktinom, a nedavno je potvrđeno da aktivacija PI3K posreduje disocijaciju aldolaze A s aktinskog citoskeleta na način neovisan od AKT. Disocijacija aktinskog citoskeleta povećava aktivnost aldolaze A u citoplazmi. Četvrti način na koji su HCC stanice reprogramirane jest izražavanje glukoneogenih enzima koje je uvelike suprimirano u HCC

¹⁸ (S., 2007-2016)

¹⁹ (Martinez-Outschoorn UE, 2017.)

stanicama. Osim toga, dok je izoforma piruvat kinaze L prevladavajuća izoforma u normalnim hepatocitima, PKM2, je glavna je izoforma u HCC stanicama.

Pod određenim uvjetima, npr. u ograničenim količinama glukoze i hranjivih tvari, stanice raka mogu se prilagoditi pomoću glukoneogenih enzima kako bi se generirali glikolitički intermedijari. Također je pronađeno da je citosolni oblik PECK, PECK-C (također poznat kao PCK1) prekomjerno eksprimiran u karcinomu debelog crijeva i ubrzava stvaranje glikolitičkih intermedijera.

Metabolizam glukoze i preživljavanje

Gubitak glukoze može dovesti do energetskog stresa i selektivne smrti tumorskih stanica u usporedbi s normalnim stanicama, no stres ne mora nužno biti uzrok apoptoze tumorskih stanica. Smanjena koncentracija glukoze uzrokuje smanjenu intracelularnu sposobnost stanica za redoks reakcije, iz razloga što je u tom slučaju smanjena proizvodnja NADPH iz puta pentoza fosfata.²⁰ Dakle, smanjene razine glukoze uzrokuju povećane koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta. Općenito, tumorske stanice i inače imaju više koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta, u usporedbi s normalnim stanicama, pa su onda i osjetljivije na apoptozu koju uzrokuju reaktivne kisikove vrste. Kod stvaranja tumora kada stanice raka razgrade dio izvanstaničnog matriksa, primjerice kada stanice raka dojke migriraju u lumen mliječne žlijezde, one prestanu konzumirati glukozu i podvrgnute su energetskom stresu i smanjenju proizvodnje ATP-a. Pored toga, razina NADPH se smanjuje, a time se povećava i unutarstanična razina reaktivnih kisikovih vrsta. Pod tim uvjetima, stanice raka su osjetljivije na staničnu smrt nego normalne stanice. Međutim, kao posljedica energetskog stresa i smanjene intracelularne razine ATP-a, aktivira se AMP-aktivirana protein-kinaza (AMPK), senzor razine ATP-a. S druge strane, AMPK inhibira acetil-CoA karboksilazu 1 (ACC1, također

²⁰ (N, 2016.)

poznat kao ACACA) i ACC2 (također poznat kao ACACB), koji su potrebni za sintezu masnih kiselina (FAS) i za inhibiciju oksidacije masnih kiselina (FAO). Ukoliko inhibira FAS, AMPK smanjuje potrošnju NADPH. Promicanjem FAO-a, AMPK povećava pretvorbu malata u piruvat, koji generira NADPH i potiče pretvorbu izocitrata u α -KG pomoću izocitrat dehidrogenaze 1 (IDH1), koji također generira NADPH. Dakle, aktivacija AMPK-a, nakon smanjene potrošnje glukoze, sprječava nagli porast unutarstaničnog ROS-a koji može uništiti stanice raka.

Zanimljivo, smanjena potrošnja glukoze i povećani energetske stres mogu se pojaviti tijekom metastaza, kada se stanice raka migriraju s primarnog mjesta tumora udaljeno mjesto. Nedavno je pokazano da se tijekom metastaza povećava razina ROS u cirkulirajućim stanicama melanoma. Razlog povećanog ROS-a nije jasno razjašnjen, ali može biti posljedica smanjenja potrošnje glukoze. Zabilježeno je da, su za borbu protiv ROS-a i za preživljavanje stanica, cirkulirajuće stanice melanoma povećale razinu NADPH promicanjem puta folata u metabolizmu jednog ugljika. Također je moguće da se AMPK aktivira u cirkulirajućim melanomskim stanicama i tako smanjuje potrošnju NADPH pomoću FAS-a i regenerira NADPH kroz reakcije pretvorbe malata u piruvat.

Moguće mete za terapiju raka u metabolizmu glukoze²¹

Jasno je da se reprogramiranje metabolizma glukoze u stanicama raka razlikuje od većine drugih normalnih stanica u tijelu. Ova se razlika iskorištava za vizualizaciju tumora in vivo, na način da se u njih unosi radioaktivno označenog analoga glukoze [18F] fluor-2-deoxyglucose (FDG) pomoću pozitronske emisijske tomografije (PET). Analog glukoze se uvodi da bi se pratila metabolička aktivnost tkiva, što odgovara unosu glukoze upravo na tom mjestu na kojem se promatra. Način na koji se dobiva analog je taj da se glukoza preuzima iz stanica koje ju koriste te se

²¹ (N, 2016.)

fosforilira heksokinazom, mitohondrijski oblik heksokinaze je povišen u brzo proliferirajućim tumorima. FDG ostaje zarobljen u stanici, koja ga koristi sve dok se ne krene raspadati, budući fosforilirani šećeri ne mogu izaći iz stanice, zbog svog ionskog naboja. To rezultira intenzivnim obilježavanjem tkiva koji imaju visoki unos glukoze, npr. mozak, jetra, bubrezi i većina tumora. Ako se iskorištavaju povišeni metabolizam glukoze u stanicama raka kako bi ih selektivno otkrili, može li se iskoristiti da ih se selektivno iskorijeni? Najjednostavniji odgovor na to pitanje je: „Da!“. Inhibicija glikolitičkih enzima kao liječenje raka može povećati rizik od nepovoljnih i neželjenih posljedica. Ipak, moguće je ciljati prijenosnike glukoze i glikolitičke enzime koji preferiraju stanice raka u usporedbi s normalnim stanicama.

Transporteri glukoze

Postoji 14 izoformi glukoznih transportera, s različitim afinitetom za glukozu i druge heksoze, a kodirani su različitim genima. Četiri glavna transportera glukoze su GLUT1, GLUT2 (također poznat kao SLC2A2), GLUT3 (također poznat kao SLC2A3) i GLUT4 (također poznati kao SLC2A4), koji imaju različit afinitet za glukozu. Relativne razine ekspresije različitih izoforma variraju u različitim tkivima²². Iako GLUT1, s visokim afinitetom za glukozu, je najviše eksprimiran, stanice raka također eksprimiraju GLUT2 i GLUT3. Zanimljivo, GLUT4 je pretežno eksprimirana izoforma, koja je potrebna za unos glukoze u multiplom mijelomu. Prijavljeno je da onkogeni KRAS inducira ekspresiju GLUT1, a stanice raka koje eksprimiraju onkogeni KRAS ili onkogeni BRAF zahtijevaju prisutnost GLUT1. Postoji nekoliko malih molekula koje inhibiraju GLUT1, i pokazalo se da selektivno ubijaju stanice raka in vitro. Međutim, široko

²² (N, 2016.)

rasprostranjena ekspresija GLUT1 u različitim tipovima normalnih stanica sisavaca može spriječiti kliničku upotrebu tih inhibitora. Germinalna delecija GLUT1 u miševa uzrokuje embrionalnu letalnost, a miševi s heterozigotnim delecijom GLUT1 preživljavaju, ali imaju konvulzije, hipoglikozu i oštećenje motoričke aktivnosti.²³

GLUT1, zajedno s drugim transporterima glukoze, također služi za transport oksidiranog oblika vitamina C (askorbinska kiselina), te dehidroaskorbinske kiseline (DHA). Unutar stanica, DHA se razlaže na vitamin C i time povećava potrošnju glutaciona (GSH) i NADPH. Nedavno je objavljeno da visoke doze DHA smanjuju intracelularne razine GSH u stanicama raka debelog crijeva (CRC) koje posjeduju sposobnost aktivacije KRAS ili BRAF mutacija i izražavaju visoke razine GLUT1. Zaključeno je da DHA selektivno ubija CRC stanice koje posjeduju aktivnost KRAS i BRAF mutacija inducirajući energetske stres. Ovi rezultati upućuju na mogućnost selektivnog ciljanja stanica karcinoma koje eksprimiraju visoke razine transportera glukoze na njihovim plazma membranama. Navedeno je da velike doze vitamina C imaju koristi kod pacijenata s rakom, a bilo je i nekoliko predkliničkih studija koje su procijenile uporabu vitamina C, ali točan mehanizam kojim on djeluje je nepoznat.

Inhibicija GAPDH(gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza) bi mogla preusmjeriti glukozu u put pentoza fosfata kako bi se generirale više razine NADPH, što bi zatim smanjilo koncentraciju oksidiranog glutaciona u GSH i ponovno aktiviralo GAPDH. Drugo, oksidacija ROS-om bi mogla inhibirati PKM2, a metaboliti bi se zatim mogli preusmjeriti od glikolize do ciklusa metabolizma jednog ugljika i folatnog puta koji generira NADPH. Treće, iscrpljivanje ATP bi aktivirao AMPK, što povećava razine NADPH smanjujući FAS, koji troši NADPH i inducira FAO, koji generira ATP i NADPH.

²³ (N, 2016.)

Stanice raka imaju visoku intracelularnu razinu ROS, te bi DHA mogla selektivno ubiti stanice raka povećavajući ROS iznad kritičnih razina. Dokazano je da stanice raka koje imaju aktiviranu RAS, BCR-ABL ili PI3K-AKT signalizaciju, imaju ujedno i visoku razinu ROS i mogu se selektivno iskorijeniti izlaganjem β -fenetil izotiocijanatu (PEITC). PEITC je prisutan u relativno velikim količinama u GMO povrću i povećava intracelularne razine ROS konjugacijom s GSH, a zatim se izlučuje iz stanica, čime se ubrzano iscrpljuju i citoplazmatski i mitohondrijski GSH.

Heksokinaze

Sposobnost skeniranja FDG-PET za otkrivanje stanica raka ne ovisi samo o visokoj razini transportera glukoze u stanicama raka, iz razloga što reverzibilni transporteri glukoze ne mogu izlučiti FDG, osim ako nije fosforiliran i zarobljen unutar tumorskih stanica. Fosforilacija FDG katalizirana je heksokinazama.

Visoka aktivnost heksokinaza u stanicama raka uglavnom je posljedica indukcije ekspresije gena HK2. Budući da HK2 nije eksprimiran u većini normalnih stanica, njegovo uklanjanje moglo bi selektivno ciljati stanice raka. Štoviše, iako je uklanjanje HK2 uzrokovalo embrionalnu letalnost, njegovo sistemsko uklanjanje kod odraslih miševa nije letalno.²⁴ Unatoč tome, alosterička inhibicija HK1 i HK2, s G6P, mogla bi se iskoristiti za usmjeravanje HK2. Iako G6P inhibira i HK1 i HK2, njegov inhibitorni učinak na HK2 povećava se u prisutnosti ortofosfata. Tako bi bilo moguće razviti G6P koji preferirano inhibiraju HK2. Kao što je gore navedeno, HCC stanice razlikuju se od normalnih hepatocita supresijom ekspresije HK4 i indukcijom ekspresije HK2. Stoga, sistemaska isporuka HK2 inhibitora, čak i ako on također inhibira HK1, može dovesti do nakupljanja lijeka na relativno visokim razinama u jetri i može selektivno ciljati HCC stanice, a ne normalne hepatocite, koji ne eksprimiraju HK2. Ova se strategija može primijeniti i na druge glikolitičke enzime koji se eksprimiraju samo u HCC

²⁴ (N, 2016.)

stanicama, a ne u zrelih hepatocitima. Uz njihove uloge u metabolizmu glukoze, HK1 i HK2 potiču preživljavanje stanica vezivanjem na mitohondrije. Mitohondrijsko vezanje je inhibirano pomoću G6P, pa iz toga razloga G6P ili druge male molekule, koje izdvajaju HK2 od mitohondrija, mogu povećati osjetljivost stanica raka na kemoterapiju.

Drugi korak glikolize

Ciljanje PFK1 izoformi, koje kataliziraju drugi počinjeni korak u glikolizi, možda neće biti izvedivo zbog njihove bitne uloge u tom procesu. Međutim, moguća je preferencijalna inhibicija drugog počinjenog koraka u stanicama raka neizravnim djelovanjem na PFK1. F2,6BP, koji je alosterički aktivator PFK1, generira PFKFB, koji posjeduje aktivnosti kinaze i fosfataze i njegove razine ovise o relativnoj aktivnosti kinaze i fosfataze različitih PFKFB izoformi. Stoga, inhibiranje njihove kinazne aktivnosti, uz zadržavanje aktivnosti fosfataze, inhibirat će aktivnost PFK1 smanjujući razinu F2,6BP. Stanice raka izražavaju relativno visoku razinu PFKFB3, koja ima veću kinaznu aktivnost od fosfatazne. Zato, inhibitori malih molekula koji inhibiraju kinaznu aktivnost PFKFB3 mogu preferirano inhibirati PFK1 u stanicama raka. Doista, razvijen je selektivni inhibitor PFKFB3 kinaze i selektivno je inhibirao proliferaciju stanica karcinoma. PFKFB4 se također eksprimira u stanicama karcinoma, a njegova ekspresija može biti povećana da kompenzira inhibiciju PFKFB3. Nedavno su razvijeni PFKFB4-specifični inhibitori, pa se i PFKFB3 i PFKFB4 mogu inhibirati da učinkovito inhibiraju PFK1 u stanicama raka. Kako je također pokazano, PFKFB3 inhibitor inhibira angiogenezu endotelnih stanica, sustavna inhibicija PFKFB3 također može inhibirati opskrbu hranjivim tvarima i kisikom u tumorskim stanicama. Inhibicija PFK1 s PFKFB

inhibitorima može povećati protok u PPP, ali i unutarstaničnu razinu G6P, te stoga također može inhibirati heksokinaznu aktivnost.²⁵

Oksidativna fosforilacija

Mitochondriji su ključne organele i ključni integratori metabolizma, sadrže vlastitu DNA (mtDNA), koja kodira 13 polipeptida oksidacijskih fosforilacijskih kompleksa, 12S i 16S rRNA i 22 tRNA potrebnih za njegovu funkciju. Kako bi se sintetizirao ATP kroz oksidativnu fosforilaciju (OXPHOS), mitochondriji troše većinu staničnog kisika i proizvode većinu reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) kao koprodukte. ROS su uključeni u karcinogenezu putem oksidativnog oštećenja makromolekula. Mitochondriji su također jedni od glavnih organela koji su odgovorni za signaliziranje apoptoze. Ovo je osobito važno jer tumorske stanice mogu steći otpornost na apoptozu pomoću brojnih mehanizama, uključujući i mitohondrijsku disfunkciju, ekspresiju anti-apoptotičkih proteina ili smanjenjem regulacije ili mutacije pro-apoptotičkih proteina. Podaci iz literature pokazuju veliku različitost u metabolizmu stanica raka, pa je sveobuhvatna stanična i molekularna osnova za povezivanje mitohondrijske bioenergetike s tumorima još uvijek nedefinirana unatoč brojnim provedenim studijama.

Istraživanje je pokazalo²⁶ da u HeLa stanicama zamjena glukoze s galaktozom / glutaminom u mediju inducira povećanu ekspresiju proteina oksidativne fosforilacije, što upućuje na povećanu proizvodnju energije iz glutamina. Kao zaključak, predloženo je da energetske supstrate može modulirati mitohondrijski oksidativni kapacitet u stanicama raka. Izravni dokaz ovog fenomena otkriven je, nekoliko godina kasnije, u stanicama glioblastoma, u kojima je dokazano da se protok TCA ciklusa održava pomoću alfa-ketoglutarata proizvedenog iz glutamina i acetilnih ostataka izvedenih iz reakcije piruvat-dehidrogenaze. Gore navedene promjene

²⁵ (N, 2016.)

²⁶ (Céline Aguer, Daniela Gambarotta, Ryan J. Mailloux, Cynthia Moffat, Robert Dent, Ruth McPherson, Mary- Ellen Harper, n.d.)

rezultat su genetske promjene koje induciraju mnoge stanice raka kako bi promijenile svoj metabolizam i sintetizirale molekule potrebne za preživljavanje, rast i proliferaciju, uključujući ribozu i NADPH za sintezu nukleotida i glicerol-3 fosfat za proizvodnju fosfolipida. Sinteza ovih posljednjih molekula zahtijeva veću količinu acetilnih ostataka koji su izvedeni iz beta-oksidacije masnih kiselina i / ili iz citosolnih citrata (reakcija citrat liaze) i / ili od reakcije piruvat-dehidrogenaze. S obzirom na potrebu za NADPH u sintezi, proizvodnja NADPH u stanicama karcinoma, osim kroz put pentoza fosfata može se provesti i citosolnim izocitrat dehidrogenazama. Zbog toga mnoge stanice raka obično imaju smanjenu razinu oksidativne fosforilacije u mitohondrijima zbog smanjenog protoka unutar ciklusa trikarboksilne kiseline.

Od posebne važnosti za proučavanje metaboličkih promjena koje nastaju u stanicama raka, je uloga heksokinaze II. Heksokinaza II fosforilira glukozu koristeći ATP sintetiziran mitohondrijskom oksidativnom fosforilacijom i oslobađa produkt ADP u neposrednoj blizini adeninskog nukleotidnog translocatora (ANT)²⁷. Opažanja iz različitih studija ukazuju na heksokinazu II kao važan alat stanice raka u preživljavanju i proliferaciji čak i u nepovoljnim uvjetima, uključujući hipoksiju.²⁸

Mnoge stanice raka ispoljavaju i niz drugih metaboličkih promjena, koje u mitohondrijima uključuju: smanjenu oksidaciju supstrata (uglavnom povezanih s NADH), promijenjenu ekspresiju i djelovanje podjedinica respiratornog lanca, prekomjernu proizvodnju ROS-a, mutaciju mitohondrijske DNA (mtDNA), narušavanje kompleksa respiratornog lanca i organizacije ATP sintaze unutar unutarnje mitohondrijske membrane i promijenjenu kontrolu apoptoze.

²⁷ Adenin nukleotidni translokator (ANT), također poznat kao ADP / ATP translokaza, zamjenjuje slobodni ATP s slobodnim ADP preko unutarnje mitohondrijske membrane. ANT je najprostorniji protein u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani. .

²⁸ (Céline Aguer, Daniela Gambarotta, Ryan J. Mailloux, Cynthia Moffat, Robert Dent, Ruth McPherson, Mary- Ellen Harper, n.d.)

Zaključak

Eksploatacija reprogramiranog metabolizma glukoze kako bi selektivno ciljale stanice raka može pružiti atraktivne i učinkovite terapijske pristupe. Međutim, problem s ovim pristupom je postojanje višestrukih izoformi glikolitičkih enzima i činjenica da inhibitori male molekule ne mogu razlikovati prevladavajuću izoformu u stanicama karcinoma i izoforme koje eksprimiraju normalne stanice. Čak i ako se postigne relativna specifičnost inhibitora, ekspresija drugih izoformi može biti inducirana kao odgovor na inhibiciju izoformi specifičnih za karcinom. Još jedan problem je da prilagodba metaboličkih puteva na korištenje alternativnih hranjivih tvari može nadvladati inhibiciju metabolizma glukoze u stanicama raka. Vjerojatno je da u mnogim slučajevima u kojima je glikoliza inhibirana, stanice će odgovoriti povećanjem oksidativne fosforilacije. Jedan od načina za zaobilaženje ove pojave je kombiniranje glikolitičkog inhibitora s inhibitorom oksidativne fosforilacije.

Kako bi se izbjeglo prilagodba i otpornost stanica raka na glikolitičke inhibitore, preporuča se koristiti ove inhibitore kao pomoćnu terapiju već odobrenoj terapiji za povećanje njihove učinkovitosti.

Jedna atraktivna strategija je kombinacija glikolitičkih inhibitora s imunoterapijom. Nedavne studije pokazale su da postoji kompeticija između tumor-infiltrirajućih T stanica i tumorskih stanica, pri čemu visoko glikolitičke stanice tumora oduzimaju glukozu i druge hranjive tvari. Budući da aktivirane T stanice koje su tumor-infiltrirajuće također imaju visoku razinu aerobne glikolize, čime se smanjuje sposobnost infiltrirajućih T stanica da reagiraju na tumorske stanice. Drugi poznati mehanizam kojim stanice tumora izbjegavaju nadzor T stanica je kroz površinsku ekspresiju liganda, programirane stanične smrti liganda 1 (PDL1, također poznat kao CD274) za programiranu smrt stanice 1 (PD1, također poznat kao PDCD1) receptor na površini T stanica. Stoga, kombinacija terapije koja cilja reprogramirani metabolizam glukoze u stanicama raka s

nedavno odobrenom imunoterapijom, kao što su PD1 ili PDL1 ciljane protutijela,

mogla bi dodatno poboljšati terapiju raka.

spoj	na što djeluje? (molekula, metabolizam)	mehanizam djelovanja	status istraživanja
2-deoksiglukoza	glikoliza	inhibicija heksokinaze	klinička ispitivanja
3-bromopiruvat	glikoliza	inhibicija heksokinaze i drugih enzima	Pretklinička istraživanja
lonidamin	glikoliza	heksokinaze	klinička ispitivanja
3PO	glikoliza	inhibicija aktivacije PFK1 ciljanjem na fosfofruktokinazu 2	Pretklinička istraživanja
BPTES	glutaminoliza	inhibicija glutaminaze 1	Pretklinička istraživanja
968	glutaminoliza	inhibicija glutaminaze 1	Pretklinička istraživanja
PKM2 inhibitori	glikoliza	inhibicija funkcije PKM2 i smanjene sinteze piruvata	
dikloroacetat	proizvodnja laktata	Blokiranje aktivnosti PDK1	faza 1 kliničkih ispitivanja
metformin	putevi proizvodnje energije	Inhibiranje mitohondrijskog kompleksa I	klinička istraživanja za tumore
FX11	proizvodnja laktata	Inhibicija funkcije laktat dehidrogenaze A	Pretklinička istraživanja
AZD-3965	transport laktata	blokiranje MCT1 aktivnosti	faza 1 kliničkih ispitivanja
L-asparaginaza	dostupnost asparagina i glutamina	promoviranje degradacije asparagina i glutamina	liječenje leukemije
enadisenib	TCA ciklus	FDA inhibitor mutirane izocitrat dehidrogenaze 2	prvi lijek odobren od strane FDA za liječenje akutne mijeloidne leukemije s mutacijom u genu IDH2
floretin	transport glukoze	transporter glutatona 1 i 4	Pretklinička istraživanja

Tablica 1- popis spojeva koji ciljano mogu djelovati na metabolizam tumora i kao takvi biti moguća adekvatna terapija za terapiju tumora

Reference

1. Altman B, S. Z. D. C., 2016.. *From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy.*
[Mrežno]
Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492215>
2. Céline Aguer, Daniela Gambarotta, Ryan J. Mailloux, Cynthia Moffat, Robert Dent, Ruth McPherson, Mary-ellen Harper, n.d. *Galactose Enhances Oxidative Metabolism and Reveals Mitochondrial Dysfunction in Human Primary Muscle Cells.* [Mrežno]
Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3240634/>
3. Hanahan D., W. R., 2011.. *Hallmarks of cancer: the next generation.* s.l.:an.
4. Martinez-Outschoorn UE, P.-P. M. P. R. S. F. L. M., 2017.. *Cancer metabolism: a therapeutic perspective.*
[Mrežno]
Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141887>
5. N, H., 2016.. *Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?.*
[Mrežno]
Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27634447>
6. O., W., 1956. *On the origin of cancer cells.* [Mrežno]
Available at: <https://matveynator.ru/f/79d34fe7164d95daf0e041e94a738ac3.pdf>
7. Phan LM, Y. S. L. M., 2014. *Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies.* [Mrežno]
Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24738035>
8. S., W., 2007-2016. *Glycolysis, respiration, and anomalous gene expression in experimental heptomas.*
s.l.:an.
9. Shinohara Y., Y. K. K. K. I. J. H., 1994. *Steady state transcript levels of the type II hexokinase and type 1 glucose in human tumour cells.* s.l.:an.



RADNO ISKUSTVO

15/04/2016–01/08/2018 **Assembler**
McDonalds, Rijeka (Hrvatska)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

01/09/2010–12/06/2014 **SSS**
Prva sušačka hrvatska gimnazija, Rijeka (Hrvatska)

OSOBNJE VJEŠTINE

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
	CPE diploma				
talijanski	B1	B1	B1	B1	B1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Komunikacijske vještine

Tijekom dvogodišnjeg rada u McDonaldsu stekla sam odlične komunikacijske vještine, što s gostima, što s kolegama s kojima sam radila.

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

[Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu](#)